

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006-2008

課題番号：18390058

研究課題名（和文） 細胞分裂における染色体の動態と高次構造に関する顕微形態機能解析

研究課題名（英文） Microscopic studies on the high-order structure of chromosomes in relation to their dynamics during mitosis.

研究代表者

牛木 辰男 (USHIKI TATSUO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40184999

研究成果の概要：細胞分裂時における染色体の挙動と構造変化は、遺伝情報（DNA）の運搬と分配を考える上できわめて重要である。そこで、本研究では、染色体の形成（凝縮）、分配（染色分体形成）、消失（脱凝縮）のメカニズムを、染色体の構造的側面から解析した。その結果、染色体は分裂後期まで凝縮を続けること、中期染色体には凝縮度の部位差があること、この部位差が、染色体タンパク質の局在と関連していること、また分裂期前の DNA 合成のタイミングとも関連していることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2007年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞微細形態学、細胞分裂、染色体、原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

細胞の増殖は有糸分裂によって起こる。このときに細胞内の遺伝情報（DNA）は、染色体に梱包され娘細胞に等分される。したがって、細胞分裂時の染色体の挙動と構造変化の解明は、細胞分裂における最も重要な研究テーマの一つである。

こうした染色体のダイナミクスを解析するために、これまでは大腸菌や酵母の分裂における DNA の複製や分配の機序について、分子生物学的な解析を中心として研究が進められてきた。しかし、ヒトないし哺乳類の細

胞分裂を見た場合、すべてが大腸菌や酵母と同じ機序で DNA の複製と分配が起こっているとは言いがたい。また、こうした分子生物学的な解析が進む一方で、ヒトや哺乳類の染色体そのものの高次構造は未解明の問題を多く残している。

研究代表者らは、顕微鏡による細胞・組織の構造解析を長く手がけてきた。特に最近は大走査型プローブ顕微鏡という新しい顕微鏡の生物学応用を推進し、DNA のような生体高分子から生きた細胞まで、その立体微細形状解析を可能にしてきた。その過程で、特に細

胞分裂時に出現する染色体の構造解析に走査型プローブ顕微鏡が有用であることを明らかにし、分裂中期染色体の高次構造を解明してきている。

2. 研究の目的

細胞分裂時における染色体の挙動と構造変化を、主に構造的側面から解析し、染色体の形成（凝縮）、分配（染色分体形成）、消失（脱凝縮）のメカニズムの解明を目指す。そのために、従来から知られている細胞生物学的手法と、近年その発展の著しい走査型プローブ顕微鏡によるイメージング法を融合させた新しいアプローチで研究に取り組む。

具体的には以下の内容の研究を行う。

- (1) 細胞分裂における染色体の挙動の動的イメージングと、その高次構造変化の解明
- (2) 染色体の高次構造変化と構成タンパク質との関連についての形態学的アプローチからの解明
- (3) DNA合成期におけるDNA複製のタイムラグが、染色体の凝縮・脱凝縮の高次構造に及ぼす影響についての形態学的アプローチからの解明
- (4) 動原体の構造と形成の形態学的アプローチからの解析

3. 研究の方法

(1) 細胞分裂における染色体の挙動の動的イメージング：培養細胞の細胞分裂像を、位相差顕微鏡によりタイムラプス撮影し、細胞分裂における染色体の基本動態を解析した。

(2) 染色体の高次構造と染色体タンパク質の局在解析：細胞分裂の各期において染色体標本を採取し、原子間力顕微鏡による液中高次構造立体解析を行った。また、染色体タンパク質（トポイソメラーゼ II α など）の免疫染色をほどこし、染色体の中のタンパク質の局在の解析を行った。さらに、液中原子間力顕微鏡観察を行った染色体の免疫染色を行い、高次構造との関係を直接比較した。

(3) DNA合成期のタイミングと染色体の高次構造変化の関連の解析：培養中の細胞にBromodeoxyuridine (BrdU) または 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を短期投与し、取り込まれた物質の染色体上での局在を細胞分裂中期の細胞で可視化（免疫染色等）した。また、標識標本の光顕像と原子間力顕微鏡像を組み合わせ、染色体の構造とDNA標識部位との関係を詳しく解析した。

(3) 動原体の微細構造解析：細胞分裂中期の染色体の動原体を電子顕微鏡と原子間力顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 細胞分裂における染色体の挙動の動的イメージングと、その高次構造変化の解明

培養細胞（Hela細胞とヒトリンパ球）の細胞分裂像を、位相差顕微鏡によりタイムラプス撮影し、細胞分裂における染色体の基本動

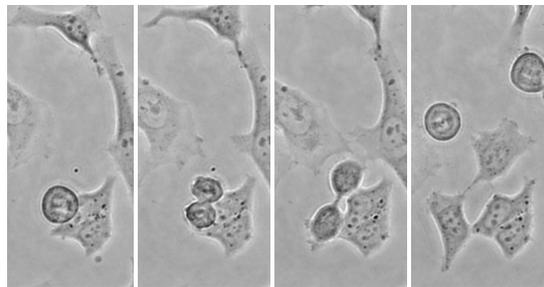


図1 HeLa細胞の分裂像の位相差顕微鏡タイムラプス撮影

態を解析した（図1）。また、各細胞の細胞周期と分裂期の時間を明らかにした。以上の結果は、本研究の次の成果を得るための基礎データとなった。

(2) 染色体の高次構造変化と構成タンパク質との関連についての形態学的アプローチからの解明。

染色体の高次構造について、これまでの原子間力顕微鏡による観察結果に本研究で得られた所見を加えて、従来の高次構造モデルとは異なるモデルを発表し、この分野に一石を投じた（図2）。

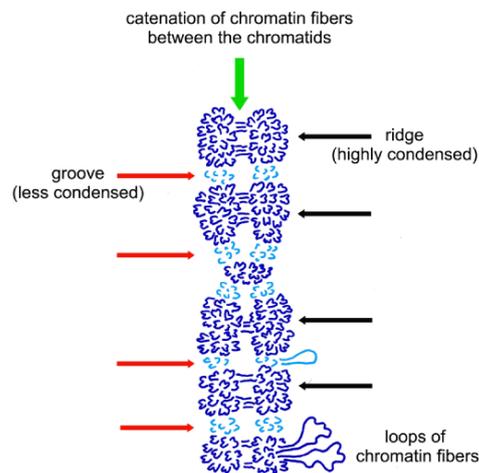


図2 中期染色体の高次構造モデル

また、分裂期の各期において染色体標本を採取し、染色体蛋白質であるトポイソメラーゼ II α の局在を免疫組織化学的に解析し、この蛋白質が染色体の軸に集積すること、染色体のバンド構造と同様なパターンを示すことを明らかにした。また、染色体の高次構造変化とトポイソメラーゼ II α の局在との関

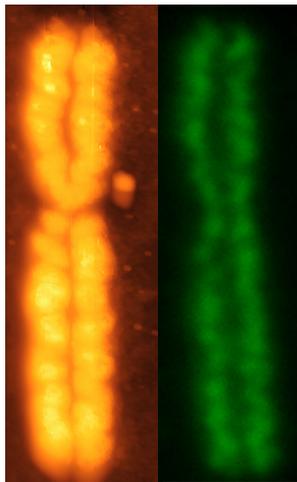


図3 同一染色体の液中原子間力顕微鏡観察像(左)とトポイソメラーゼ II α 免疫染色像(右)

係を明瞭に示すために、液中原子間力顕微鏡観察を行った染色体のトポイソメラーゼ II α 免疫染色を行い、蛍光顕微鏡観察を行うことで、トポイソメラーゼ II α 陽性部位と染色体の腕部の凝縮の強い部位がほぼ一致することを明らかにした(図3)。

さらに、染色体の液中高速イメージングを可能にしたが、これは今後の原子間力顕微鏡の動的イメージングへの可能性を切り開いたものである。

(3) DNA 合成期のタイミングと染色体の高次構造変化の関連の解析

培養細胞をダブルチミジン法により細胞周期を同調させた後に、DNA 合成期の前半と後半に Bromodeoxyuridine (BrdU) を短期投与する実験系を確立した。この方法で DNA 合成期に BrdU を取り込ませた細胞を細胞分裂の中期で固定し、その染色体に対して Brd の蛍光免疫染色を行うと、染色体にバンド状のパターンが観察できた。

しかし、この方法では、染色性がやや不安定であることから、さらに方法を改善し、BrdU の代わりに 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を投与しアジ化蛍光色素で発色させる

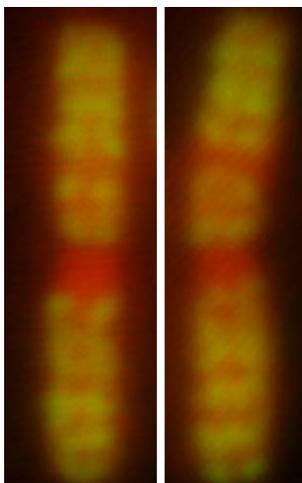


図4 DNA 合成前半期に EdU を取り込んだ細胞の分裂中期1番染色体

方法を開発した。これにより、染色体に取り込まれた EdU のバンド状の蛍光パターンを明瞭に示すことができた。(図4)。

この方法と原子間力顕微鏡による高次構造観察所見を組み合わせ、ヒト1番染色体と2番染色体の解析を行った結果、DNA 合成期の前半に EdU を取り込ませた細胞では、染色体に R バンドに類似のバンドパターンが、また DNA 合成期の後半に取り込ませた細胞では、染色体に G/Q バンドと類似したバンドパターンが認められた。

以上の所見は、DNA 合成期における DNA 複製のタイムラグと、染色体の凝縮・脱凝縮の高次構造とのあいだに強い関連性があることを示唆している。つまり、DNA 合成期における DNA 複製の開始部位や複製のタイミングが各染色体において一定で、R バンドや G/Q バンドと関連している可能性を示すユニークな所見である。今後、さらなる研究の進展が期待できる分野である。

(4) 動原体の微細構造解析

細胞分裂時の紡錘糸と染色体の動原体を走査電子顕微鏡で3次元構造解析することを試みたが、結果を得るに至らず、今後の課題として残された。

(5) まとめと展望

本研究では、細胞分裂時における染色体の挙動と構造変化を、主に構造的側面から多様な顕微鏡技術を併用して解析した。これにより、染色体の構造が染色体を構成するタンパク質の局在と関係していること、さらに DNA 合成期の DNA 合成のタイミングとも関係していることを示した。こうした所見は、染色体の形成(凝縮)、分配(染色分体形成)、消失(脱凝縮)のメカニズムを考える上で重要である。本研究では、染色体の動態(とくに分裂期における形態変化)の詳しい解明が途中で終わったが、今後の研究の方向性を決める多様なデータが得られた点は、きわめて有益であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① LM Picco, PG Dunton, A Ulcinas, DJ Engledew, O Hoshi, T Ushiki, MJ Mile, High-speed AFM of human chromosomes in liquid. Nanotechnology, 19, 384018(6pp), 2008, 査読有
- ② T Ushiki, M Shigeno, and O Hoshi, Techniques for imaging human metaphase chromosomes in liquid conditions by

atomic force microscopy, Nanotechnology, 19, 384022(5pp), 2008, 査読有

- ③ T Ushiki and O Hoshi, Atomic force microscopy for imaging human metaphase chromosomes, Chromosome Research, 16, 383-396, 2008, 査読有
- ④ 牛木辰男・星 治、バイオ試料観察における液中AFMとQコントロール、表面科学、28、665-667、2007、査読有
- ⑤ 牛木辰男、走査型プローブ顕微鏡による生体構造の機能とイメージング、臨床検査、50、1529-1536、2006、査読無

[学会発表] (計 13件)

- ① 星 治、佐野裕太、牛木辰男、ヒト染色体の高次構造についての原子間力顕微鏡像と光顕像の比較による解析、第114回日本解剖学会学術講演会、2009年3月28～30日、岡山
- ② T Ushiki and O Hoshi, Scanning probe microscopy of human chromosomes, 3rd Asian Chromosome Colloquium 2008, 2008年12月1～3日、大阪
- ③ 星 治、牛木辰男、ヒト染色体の高次構造とトポイソメラーゼII α の局在との関係について、日本顕微鏡学会SPM研究部会、2008年11月28,29日、越後湯沢
- ④ T Ushiki and O Hoshi, Atomic force microscopy of human chromosomes, 10th International Scanning Probe Microscopy Conference, 2008年6月20～25日、シアトル (USA)
- ⑤ 星 治、牛木辰男、原子間力顕微鏡と光学顕微鏡の併用によるヒト染色体の構造機能解析法、日本顕微鏡学会第64回学術講演会、2008年5月19～23日、京都
- ⑥ 星 治、牛木辰男、細胞分裂におけるDNA合成のタイムラグが染色体の高次構造に及ぼす影響について、第113回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008年3月29日、大分
- ⑦ 星 治、牛木辰男、ヒト染色体の光顕像と液中原子間力顕微鏡の比較－DNA合成期のタイムラグが染色体の高次構造に及ぼす影響について－、日本顕微鏡学会SPM研究会、2007年12月9日、越後湯沢
- ⑧ T Ushiki, Imaging of biological soft samples by atomic force microscopy. 6th International Symposium on Atomic Level Characterization for New Materials and Devices '07, 2007年10月30日、金沢
- ⑨ 牛木辰男、AFMによる液中バイオ観察の諸問題、日本応用物理学会・有機バイオSPM研究会、2007年8月29日、幕張 (千葉)
- ⑩ T Ushiki, Scanning probe microscopy for imaging human chromosomes, XIX International Symposium of

Morphological Sciences, 2007年8月21日、ブダペスト (ハンガリー)

- ⑪ 川端和重、星 治、牛木辰男、染色体の凝集機構解明のためのSPM観察、日本顕微鏡学会第63回学術講演会、2007年5月21日、新潟
- ⑫ 繁野雅次、星 治、牛木辰男、液中強震モードSPM専用プローブの開発、日本顕微鏡学会第63回学術講演会、2007年5月21日、新潟
- ⑬ 星 治、牛木辰男、ヒト染色体の高次構造とDNA合成のタイミングとの関係－AFMと免疫蛍光染色－日本顕微鏡学会第63回学術講演会、2007年5月21日、新潟

[図書] (計 2件)

- ① K Fukui, T Ushiki (ed), Taylor & Francis Group, Chromosome Nanoscience and Technology, 2007 (総頁267pp)
- ② T Ushiki and Kawabata (eds, Bhushan et al.), Springer, Applied Scanning Probe Methods X, 2008 (分担、pp.285-308)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛木 辰男 (USHIKI TATSUO)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：40184999

(2) 研究分担者

星 治 (HOSHI OSAMU)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：10303124

甲賀大輔 (KOGA DAISUKE) 2008年度のみ
新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30467071

(3) 連携研究者

なし